

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-140683

(43)公開日 平成8年(1996)6月4日

| | | | | |
|-----------------------------------|------|---------|------------|--------|
| (51)Int.Cl. ⁴ | 識別記号 | 庁内整理番号 | FI | 技術表示箇所 |
| C12N 15/09 | ZNA | | | |
| C07H 21/04 | | B | | |
| C07K 14/54 | | 8318-4H | | |
| | | 9281-4B | C12N 15/00 | ZNA A |
| | | 7729-4B | 5/00 | B |
| 審査請求 未請求 請求項の数10 OL (全11頁) 最終頁に続く | | | | |

(21)出願番号 特願平6-293233

(22)出願日 平成6年(1994)11月28日

(71)出願人 594194653

鈴木 和男

千葉県夷隅郡岬町椎木663-2

(72)発明者 鈴木 和男

千葉県夷隅郡岬町椎木663-2

(72)発明者 山越 智

千葉県柏市新柏1-18 新柏住宅4-102

(72)発明者 山河 芳夫

千葉県流山市南流山6-29-1 南流山荅番街2-702

(72)発明者 水野 左敏

千葉県船橋市夏見台3丁目10-3-401

(74)代理人 弁理士 津国 章 (外2名)

(54)【発明の名称】 新規な白血球活性化因子

(57)【要約】

【構成】 配列表の配列番号1～5に示されるアミノ酸配列をその順番で有する、ヒト由来の他のタンパク質を実質的に含有しないヒトLECT2aポリペプチド、並びに配列表の配列番号6に示されるアミノ酸配列を有する、ヒト由来の他のタンパク質を実質的に含有しないヒトLECT2bポリペプチド、およびそれをコードするDNA。

【効果】 本発明の物質は、免疫細胞に関与する新しいサイトカイン／インターロイキンであり、腫瘍免疫としての治療、診断はもちろん、癌予知および癌予後の免疫反応の検出などに利用できる。また、腫瘍の治療への応用の可能性も充分考えられる。さらに、慢性炎症にも深くかかわっていることが推定されるので、これら疾病の診断、治療をはじめ、サイトカインネットワーク機能異常、免疫不全を検出する新しい基礎研究に道を開くことができる。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表の配列番号1～5に示されるアミノ酸配列をその順番で有する、ヒト由来の他のタンパク質を実質的に含有しないヒトLECT2aポリペプチド。

【請求項2】 配列表の配列番号6に示されるアミノ酸配列を有する、ヒト由来の他のタンパク質を実質的に含有しないヒトLECT2bポリペプチド。

【請求項3】 配列表の配列番号6に示されるアミノ酸配列を有するヒトLECT2bをコードするDNA。

【請求項4】 ヌクレオチド配列が、配列表の配列番号7に示される配列である、請求項3記載のDNA。

【請求項5】 配列表の配列番号6に示されるアミノ酸配列を有するヒトLECT2bをコードするDNAを含む組換えプラスミド。

【請求項6】 組換えプラスミドが、ヒトLECT2bをコードするDNAを、tacプロモーターの制御下にマルトース結合タンパク質との融合タンパク質の形態で、マルトース結合タンパク質とLECT2bとの連結部位にTEVプロテアーゼの切断部位を入れた形で発現させることができるプラスミドpMAL-TEV-LECT2bである、請求項5記載の組換えプラスミド。

【請求項7】 ヒトLECT2bをコードするDNAが、SRαプロモーターの制御下にある、請求項5記載の組換えプラスミド。

【請求項8】 組換えプラスミドが、ヒトLECT2bをコードするDNAを、tacプロモーターの制御下にグルタチオン-S-トランスフェラーゼとの融合タンパク質の形態で、グルタチオン-S-トランスフェラーゼとLECT2bとの連結部位にXaプロテアーゼの切断部位を入れた形で発現させることができるプラスミドpGEX-Xa-LECT2bである、請求項5記載の組換えプラスミド。

【請求項9】 配列表の配列番号6に示されるアミノ酸配列を有するヒトLECT2bをコードするDNAを含む組換えプラスミドにより形質転換された宿主細胞。

【請求項10】 宿主細胞が、チャイニーズハムスターCHO細胞、サルCV1細胞、サルCV1/293細胞、マウス線維芽細胞、マウスC127細胞、マウス3T3細胞、マウスL-929細胞、ヒトHeLa細胞、またはヒトSKW-3細胞である、請求項9記載の宿主細胞。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、新規な構造を有するヒト由来白血球活性化タンパク質因子およびそれをコードする遺伝子DNAに関する。本発明は、上記遺伝子DNAを有する組換えプラスミド、およびそれを用いて形質転換した形質転換体にも関する。

【0002】

2

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】好中球が、マクロファージ、リンパ球などに加えて癌細胞破壊反応へ関与することが示唆されている。また、多くの癌組織の病理標本で好中球の癌細胞周辺への浸潤像が観察されている。これらのことは、好中球が癌細胞の分泌する走化性因子に反応した結果であると考えられる。

【0003】したがって、好中球、マクロファージ、リンパ球などを活性化することによって、癌細胞破壊反応の亢進やインターロイキン類の分泌の促進等が誘導され、自然免疫能が高められるので、白血球活性化因子を簡便に大量に安定的に調製することができれば、腫瘍免疫としての治療、診断、予後の判定などはもちろん、好中球、リンパ球、マクロファージの基礎研究分野での活性化機構解明の研究にも利用することができる。

【0004】これまでに我々は、白血球浸潤が認められる組織像を示すヒト肺巨細胞癌より樹立した細胞を用いて、この細胞が放出する好中球走化性因子インターロイキン8(LUCT/IL-8)を発見、精製分離し、その遺伝子をクローニングしてきた。IL-8は、分子量約8kDaの単純タンパク質で等電点は10.3と高く、77アミノ酸残基のものと72アミノ酸残基からなるものの2種類が主なIL-8で、双方とも同等の活性がある。IL-8は炎症性のサイトカインであることから、慢性炎症において血中に放出されることも知られている。

【0005】しかしながら、IL-8とは異なる好中球走化性因子が好中球と癌細胞との相互作用のメディエーターとして関与している可能性が考えられたので、新しい走化性因子を検索することが必要であった。

【0006】

【課題を解決するための手段】今回、我々は、新規な白血球走化性因子を検索するに際し、白血球走化活性を指標にして各種ヒト造血系腫瘍細胞株97種の細胞培養液をスクリーニングした結果、T細胞白血病細胞SKW-3の培養液中に走化性をもつタンパク質性因子を検出した。この因子を精製分離したところ、SDS-PAGEによる分子量は約16kDaとIL-8の2倍の大きさであった。そこでアミノ酸配列を決定した結果、新しい走化性因子であることが判明し、LECT2(Leukocyte-derived chemotaxin 2)、特にLECT2aと命名した。さらにLECT2aのcDNAのクローニングを試みた。部分アミノ酸配列をもとに合成したプライマーを用いてRT-PCR法によりLECT2aのcDNAの一部と考えられるcDNA断片を増幅し、ほぼ完全長と考えられるcDNAをクローニングし、塩基配列を決定したところ、完全にLECT2aのアミノ酸配列とは一致せず高ホモロジーを示すタンパク(LECT2bと命名)をコードすることがわかった。

【0007】その結果、本発明の白血球活性化因子LECT2には、生物学的活性が白血球の活性化の点で共通

50

しており、アミノ酸配列が異なる少なくとも2種類のタンパク質、すなわち、LECT2aおよびLECT2bが存在することがわかった。LECT2aのアミノ酸配列と、LECT2bのcDNAから推定されるアミノ酸配列との比較から、これらのタンパク質のアミノ酸レベルでの相同性は約90%であることがわかっている。LECT2aのアミノ酸配列は、N末端に近い方から順に配列表の配列番号1〜5に示されている。LECT2bの推定アミノ酸配列は配列番号6に示されている。配列番号7には、LECT2bのcDNAのヌクレオチド配列および推定アミノ酸配列を示す。配列番号6および7において、アミノ酸番号58のValは、場合によりIleであることもあり、これは個体の遺伝的バックグラウンドによる多型と思われる。また、配列番号8は、LECT2aとLECT2bのアミノ酸配列を並記して比較するものである。LECT2aのアミノ酸配列の空白部分は、分子量がLECT2a、LECT2b共約16kDaであること、アミノ酸組成が両者で非常に似ていることから、LECT2bと高ホモロジーを示すと考えられる。

【0008】すなわち、本発明の白血球活性化因子は、配列表の配列番号1〜5の配列、または配列番号6の配列を有するヒトLECT2ポリペプチドである。さらに詳しくは、配列表の配列番号1〜5に示されるアミノ酸配列をその順番で有する、ヒト由来の他のタンパク質を実質的に含有しないヒトLECT2aポリペプチド、および配列表の配列番号6に示されるアミノ酸配列を有する、ヒト由来の他のタンパク質を実質的に含有しないヒトLECT2bポリペプチドである。

【0009】本発明は、配列表の配列番号6に示されるアミノ酸配列を有するヒトLECT2bをコードする遺伝子DNAにも関し、特に、ヌクレオチド配列が、配列表の配列番号7に示される配列であるヒトLECT2b遺伝子DNAにも関する。

【0010】本発明はさらに、配列表の配列番号6に示されるアミノ酸配列を有するヒトLECT2bをコードする遺伝子DNAを含む組換えプラスミドにも関する。さらに詳しくは、ヒトLECT2bをコードする遺伝子DNAを、tacプロモーターの制御下にマルトース結合タンパク質との融合タンパク質の形態で、マルトース結合タンパク質とLECT2bとの連結部位にTEVプロテアーゼの切断部位を入れた形で発現させることができるプラスミドpMAL-TEV-LECT2bに関する。プラスミドpMAL-TEV-LECT2bは、*E. coli* JM109株から得ることができる。また、本発明は、ヒトLECT2bをコードするDNAが、SRαプロモーターの制御下にある、LECT2bを高発現することが可能な組換えプラスミドにも関する。本発明は、ベクターとしてpGEX-3Xを用いて得られる、ヒトLECT2bをコードする遺伝子DNAを、tacプロ

モーターの制御下にグルタチオン-S-トランスフェラーゼとの融合タンパク質の形態で、グルタチオン-S-トランスフェラーゼとLECT2bとの連結部位にXaプロテアーゼの切断部位を入れた形で発現させることができるプラスミドpGEX-Xa-LECT2bにも関する。

【0011】本発明は、さらに、配列表の配列番号6に示されるアミノ酸配列を有するヒトLECT2bをコードするDNAを含む組換えプラスミドにより形質転換された宿主細胞、特にチャイニーズハムスターCHO細胞、サルCV1細胞、サルCV1/293細胞、マウス線維芽細胞、マウスC127細胞、マウス3T3細胞、マウスL-929細胞、ヒトHeLa細胞およびヒトSKW-3細胞にも関する。

【0012】白血球活性化とは、好中球、単球（マクロファージ）、リンパ球の機能の活性化をいう。具体的には、好中球および単球（マクロファージ）においては、粘着能、遊走能（走化性）、食食能、活性酸素産生能、ライソゾーム酵素放出（脱顆粒）能、細胞障害作用（がん細胞破壊作用を含む）および各種サイトカイン産生・分泌、また、リンパ球においては、抗体産生、各種サイトカイン産生・分泌、レセプターの発現である。

【0013】本発明の白血球活性化因子は、白血病細胞のような細胞の培養上清からタンパク質をCM-セファロースで濃縮し、DEAE-セファロース、CM-セファロース、HPLCによるハイドロキシアパタイト、逆相クロマトグラフィにかけることにより単品として精製することができる。例えば、培養したSKW-3などの白血病細胞をPHA-Pにより刺激して培養上清中に本発明の白血球活性化因子を放出させ、この上清から、カラムクロマトグラフィなどの手法を用いて本発明の白血球活性化因子を精製することができる。

【0014】また、本発明の白血球活性化因子は、本発明の組換えプラスミドを用いて作製した形質転換体に産生させてもよい。本発明の組換えプラスミドは、例えばpMALTM-C (BioLab Inc.)、またはpGEX-3X (Pharmacia Inc.) をベクターとして用いて作製することができる。宿主細胞としては、従来公知の細菌（大腸菌など）、酵母および動物細胞を用いることができる。例えば、チャイニーズハムスターCHO細胞、サルCV1細胞、サルCV1/293細胞、マウス線維芽細胞、マウスC127細胞、マウス3T3細胞、マウスL-929細胞、ヒトHeLa細胞およびヒトSKW-3細胞などが挙げられる。細胞の培養、培養上清からの本発明のタンパク質の精製、組換えプラスミドの作製、形質転換の方法、さらに形質転換体からの本発明のタンパク質の採取は、当業者に公知の標準的手法を用いて実施することができる。

【0015】本発明を以下の実施例によりさらに詳しく説明する。

【0016】

【実施例】

1. LECT2aの精製

試薬として、以下のものを用いた。

1) 1%ウシ血清アルブミン(BSA)/DDW

2) ×5 R緩衝液(250mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH7.4)

R緩衝液は、50mM NaPB、pH7.4である。

3) R5緩衝液(0.005%BSAを含む50mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH7.4)

R1緩衝液(0.001%BSAを含む50mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH7.4)

4) CM溶出緩衝液(0.7M NaClを含むR1緩衝液)

【0017】方法

1) SKW-3細胞を、10%ウシ胎児血清を含むRPMI-1640培養液に刺激剤としてPHA-P(DIFCO社製)5μg/mlになるよう加えた中で、37℃で24時間、5%CO₂を含む大気中でインキュベートした。この培養上清7Lを遠心により採取し、-20℃にて凍結した。

2) 上記で得られた凍結サンプル7Lを、20Lの蒸留水にいれ、解凍した。

これを用いて以下の手順により本発明の白血球活性化因子を精製した。

【0018】部分精製

1) 解凍サンプルに200mlのCM-セファロースCL-6B(R緩衝液に懸濁したもの)を加えた。

2) 4℃で4時間攪拌した。

3) キリヤマロートで(フィルター5B 3シート)濾過した。

4) 冷蒸留水500mlで洗浄した。

5) さらに、100mlのR5緩衝液で2回洗浄した。

6) 次に、300mlの溶出緩衝液で溶出した。

*

表1. LECT2aの精製

| | 容量 (ml) | 活性 (CTU) | タンパク質 (mg) | 比活性 (CTU/mg) |
|-------------------------|------------|-------------------|---------------|-------------------|
| 培養上清 | 7,000 | 1.0×10^7 | 47,200 | 211 |
| CM-セファロース CL6B 溶出液 | 280 | 7.7×10^6 | 3,400 | 2,255 |
| DEAE-セファロース CL6B 素通り画分 | 300 | 7.0×10^6 | 1,800 | 3,888 |
| CM-セファロース CL6B クロマトグラフィ | 4 | 2.4×10^4 | 3.6 | 6,667 |
| 逆相クロマトグラフィ(TMS-300) | 2 | 2.1×10^4 | 0.068 | 6.2×10^5 |

【0021】分子量の決定

上記のようにして得たサンプル中のLECT2aの分子量を、トリシン-SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)(16.5%モノアクリルアミド/ビスアクリルアミド; 3%ビス/モノアクリルアミド+ビス)により決定した。結果を図1に示す。この結果から、SDS-PAGEにより決定したLECT2aの分

50

* 7) 3LのR緩衝液に対して2回透析を行った。

8) 25mlのDEAE-セファロース懸濁液を加えた。

9) 4℃で2時間攪拌した。

10) キリヤマロートで(フィルター5B 3シート)濾過した。

11) 25mlのR5緩衝液で2回洗浄した。

12) CM-セファロースカラム(3mlバック)にかけた。

13) R1緩衝液3mlで2回洗浄した。

14) 10mlのR1緩衝液と10mlの0.7M NaCl/R1緩衝液を用いる直線グラジエントで溶出した。

15) フラクション8~11を部分精製品として採取した。

【0019】HPLCによる完全精製

1) 部分精製2回分をまとめた。

2) サンプル2.5ml(1.2 O.D.)をHPLCのRPカラム5TMS-300(F39001)(4.6×250mm)にかけた。

3) グラジエント: 30~80%B/60分で溶出させた。[A液: 0.1%テトラフロロ酢酸(TFA); B液: 0.1%TFAを含む75%アセトニトリル]

4) フラクション2~7(16.5ml)を集めた。

5) サンプルをVydac C4カラム 304-2151(6×150mm)にかけた。

6) グラジエント: 30~80%B/60分で溶出させた。

7) 4Lの25mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.4で2回透析した。

8) サンプルは-80℃に保存した。

以上の手順により精製した際のLECT2aの精製を表1に示す。

【0020】

【表1】

分子量は約16kDaであることがわかる。

【0022】活性の検定

1. 好中球活性化

以下において、HBSSとは、ハンクス溶液(1L中、0.4g KCl、8g NaCl、0.15g KH₂PO₄、0.29g Na₂HPO₄・7H₂O、1.1g D-グルコース)である。

1) 好中球走化活性

好中球走化活性測定のためのサンプルを1%BSA、0.4%重炭酸ナトリウムを含むHBSSに溶かし、3 μ mのポアサイズのミリポアフィルターで仕切ったボイデンチャンバーの下室に200 μ l入れ、次いで、HBSS中に 2×10^6 cells/mlの濃度に調製したヒト好中球(200 μ l)を上室に入れ、5%CO₂インキュベーター中で、37℃、35分間培養し、エタノールで固定後、ヘマトキシリン溶液で染色し、好中球の移動距離を顕微鏡で測定した。その結果、50%活性を示す濃度は40nMであった。

【0023】2) 好中球ライソゾーム酵素放出活性

HBSS中に 2×10^6 cells/mlの濃度に調製したヒト好中球(37.5 μ l)にサンプル10 μ lを加え、場合によってサイトカラシンB(5 μ g/ml)、fMet-Leu-Phe(10^{-11} ~ 10^{-13} M)を加え、総量75 μ lとし、37℃で、10分間インキュベートした。遠心(1,500rpm、5min)により細胞外液と細胞に分け、細胞は0.1%トリトンX-100/HBSSを加えて混合し、破碎した。細胞外液と細胞破碎液中のライソゾーム酵素ミエロペロキシダーゼ(MPO)、 β -グルクロニダーゼ(BGL)、ラクトフェリンを以下のように測定した。

【0024】a) MPO活性測定

*

【表2】

表2. LECT2aの白血球活性化活性

| LECT2a濃度(M) | 酵 素 放 出 (%Release*) | | | 活性酵素産生 (nmoles/ml) | 細胞粘着 (%) | 流動性 (秒/ μ m) |
|-------------|------------------------|-----|---------|-----------------------|-------------|---------------------|
| | MPO | BGL | ラクトフェリン | | | |
| 0 | 24 | 45 | 14 | 12 | 88 | 36 |
| 10^{-11} | 25 | 43 | 14 | 14 | 88 | 38 |
| 10^{-10} | 27 | 46 | 17 | 13 | 86 | 33 |
| 10^{-9} | 26 | 46 | 16 | 12 | 89 | 36 |
| 10^{-8} | 24 | 44 | 17 | 11 | 90 | 39 |
| 10^{-7} | 25 | 44 | 16 | 15 | 93 | 42 |
| 10^{-6} | 28 | 49 | 20 | 18 | 92 | 49 |
| 10^{-5} | 35 | 52 | 25 | 25 | 95 | 53 |

* %Release = 100×細胞外活性/(細胞外活性+細胞内活性)

CB (サイトカラシンB) + fMLP (fMet-Leu-Phe; 10^{-9} M) にて刺激

【0026】3) 好中球活性酸素産生活性

HBSS中に 2×10^6 cells/mlの濃度に調製したヒト好中球(100 μ l)にフェリシトクロームc(1.32mM)を10 μ l、サンプルの10 μ lを加え、場合によってサイトカラシンB(5 μ g/ml)、fMet-Leu-Phe(10^{-11} ~ 10^{-13} M)を加え、総量200 μ lとし、37℃でインキュベートし、550nmの吸光度の時間あたりの変化量より活性酸素産生量を算出した。結果を表2

* 基質として3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジンを用い、マルチウエル用オートマチックアナライザーで655nmにおける吸光度の増加率より定量した。1 unitは655nmの吸光度が1mlあたり1.0とした。

b) BGL活性測定

4-メチルウンベリフェリル β -グルクロニドを基質としてマルチウエル用オートマチックアナライザーで360nm励起(excitation)、450nm発光(emission)の蛍光の増加率より定量した。1 unitは1mlあたり1分間に1 pmolの4-メチルウンベリフェロン遊離とした。

c) ラクトフェリン測定

抗ヒトラクトフェリンヤギIgG(NOR社、GAHu/Lfr)を1,000倍希釈したもの100 μ lを96ウエルプレートにまき、洗浄後、好中球からの放出外液と細胞破碎液100 μ lを入れ、1時間室温でインキュベートした。洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgG(CPL 3612-0081)を1,000倍希釈したもの100 μ lを96ウエルプレートにまき、1時間室温でインキュベートした。ペルオキシダーゼ基質と反応させ、492nmの吸光度を測定し、標準品より、ラクトフェリンを定量した。

以上のa)~c)の結果を表2に示す。

【0025】

に示す。

【0027】4) 好中球粘着活性

HBSS中に 2×10^6 cells/mlの濃度に調製したヒト好中球(100 μ l)をスライドチャンバーにいれ、サンプルの10 μ lを加え、場合によってfMet-Leu-Phe(10^{-11} ~ 10^{-13} M)を加え、総量150 μ lとし、5%CO₂インキュベーター中で、37℃、15分間培養し、粘着しなかった細胞を吸い取り、細胞数を測定し

た。また、スライドチャンバーはエタノールで固定後、サフラニン染色し、細胞の粘着を測定した。結果を表2に示す。

【0028】5) 好中球膜流動性

蛍光色素F I T C標識のコンカナバリンA (FS-ConA) と好中球を予め0°Cで10分間静置後、HBSSを加えて遠心し、HBSS中に 2×10^6 cell/mlの濃度に調製したFS-ConA標識ヒト好中球(100 μ l)をスライドチャンバーにいれ、サンプルの10 μ lを加え、場合によってfMet-Leu-Phe(10^{-8} M)を加え、総量150 μ lとし、37°Cでインキュベートしながら、細胞上の蛍光の運動をニコン倒立顕微鏡に接続した画像解析装置(IMRAS)にて撮像および解析した。

【0029】2) 単球、リンパ球の走化活性

1) の好中球走化活性とはほぼ同様に行った。ただし、ミリポアフィルターは5 μ mのポアサイズのものを用い、75分間インキュベートした。50%活性を示す濃度は、単球については220nMで、リンパ球については430nMであった。

【0030】2. 精製されたタンパク質LECT2aのアミノ酸配列

上記のように精製したタンパク質LECT2aのアミノ酸配列は、エドマン法でアプライドバイオシステムズ社製モデルABIにより決定した。得られた配列を配列表の配列番号1~5に示す。

【0031】3. LECT2bのクローニングおよびクローニングされたLECT2bのヌクレオチド配列の決定

LECT2b cDNAのクローニングは次のようにして行った。50 μ g/mlのPHA-PでSKW-3を処理しpolyA⁺ RNAを調製した。5 μ gのpolyA⁺ RNAを用い、oligo-dTをプライマーにしてファーストストランドcDNA(1st cDNA)を合成した。次に、決定したLECT2aの部分アミノ酸配列を基にPCRのプライマーを合成した。アミノ酸配列W A I I C Aより6種類のオリゴヌクレオチドを演繹して5'のプライマーとし、H I E N C Dより4種類のオリゴヌクレオチドを演繹して3'のプライマーとした。PCR法により、1st cDNAを鋳型とし上記プライマーの組み合わせである24種類の反応にてDNA断片の増幅を行った。アミノ酸配列D V L C S D G S T V Y A P Fを基にDNAプローブ(GATGTC/GCTA/GTGC TCT/CGATGCC/GTCT/CACT/AGTC/GTATGCT/CCCT/CTT)を使い、増幅されたDNA断片をアガロースゲルで分離し、サザンブロットにより解析した。その結果、約370bpのDNA断片が検出され、それをpUC19にクローニングした。

【0032】デオキシ法にて塩基配列を決定したところ、LECT2aに約90%のホモロジーを持つペプチ

ドをコードすることが判明した。ヒト肝臓cDNAライブラリーを、クローニングされたcDNA断片をプローブとしてスクリーニングした。130万個のクローン中12クローンの陽性クローンを得た。それぞれのクローンはすべて、制限酵素の解析により2種類に分けられることがわかり、それぞれのグループの一番長いcDNA断片のクローンの塩基配列の決定をした。その結果、2種類のcDNAは同一の遺伝子由来で3'側に存在する2種類のpolyAシグナルにより生じることが推定された。また、コードされたタンパク質のアミノ酸配列よりLECT2aの決定されたアミノ酸配列に約90%のホモロジーを有することが判明し、このコードされると考えられるタンパク質をLECT2bと命名した。

【0033】4. LECT2b遺伝子を含む組換えプラスミドの構築

クローニングされたLECT2b cDNAをもとに、5'側のプライマーとしてGCCGAATTCGAAACCTGTATTTTCACGGCCCTGGCTAATATATG、3'側のプライマーとしてCGCAAGCTTTTACAGGTATGCAGTAGをそれぞれ用い、熱変性: 94°C、1分間、アニーリング: 55°C、2分間、伸長反応: 72°C、3分間、の25サイクルのPCR法にてLECT2bのcDNAを含むDNA断片を増幅させた。EcoRI、HindIIIでの処理後、この断片をpMAL⁺-C (Biolab Inc.) のEcoRI/HindIII部位にクローニングした。この組換えプラスミドを、pMAL-TEV-LECT2bと命名した。この発現ベクターは、IPTG存在下で、tacプロモーターの制御下マルトース結合タンパク質(maltose-binding-protein)とLECT2bの融合タンパク質を産生させることができ、その連結部分にTEVプロテアーゼ(Tabacco Etch Virus由来)の切断部位が入っているので特異的な切断ができることが特徴である。

【0034】また、クローニングされたLECT2b cDNAをもとに、5'側のプライマーとしてCCCGCATCCCCGGCCATGGCTAATAT、3'側のプライマーとしてCCCGATCCTTACAGGTATGCAGTAGをそれぞれ用い、熱変性: 94°C、1分間、アニーリング: 55°C、2分間、伸長反応: 72°C、3分間、の25サイクルのPCR法にてLECT2bのcDNAを含むDNA断片を増幅させた。BamHIで処理後、この断片をpGEX-3X (Pharmacia Inc.) のBamHI部位にクローニングした。この組換えプラスミドを、pGEX-Xa-LECT2bと命名した。この発現ベクターは、IPTG存在下で、tacプロモーターの制御下グルタチオン-S-トランスフェラーゼとLECT2bの融合タンパク質を産生させることができ、その連結部分にXaプロテアーゼの切断部位が入っているため特異的な切断ができることが特徴である。

【0035】5. LECT2b遺伝子を含む組換えプラスミドによる大腸菌の形質転換

上記のようにして得られた組換えプラスミドpMAL-TEV-LECT2bを用いて大腸菌JM109株を形質転換後、得られた大腸菌クローンを、デオキシ法により期待された塩基配列を有するものに関してスクリーニングし、期待されるDNA断片を持つ大腸菌クローンMa1-LECT2b(寄託番号FERMP-14669)を得た。

【0036】6. 動物細胞によるLECT2bの産生
pUC19のBamHI部位にHindIIIからEcoRIの方向でクローニングされたLECT2b cDNAの5'側をエキソヌクレアーゼIIIにより-14の塩基配列まで欠失させ、T4 DNAポリメラーゼで平滑末端にした後、PstIリンカーをライゲーションし、PstIとBglIIで切断し、発現ベクターpcDL-SRα294のPstI/BamHI部位にクローニングした。この組換え発現ベクターをチャイニーズハムスターCHO細胞にトランスフェクションし、LECT2*

*bを高発現する株1株(C1D8-1)(寄託番号FERMP-14668)を得た。

分子量の決定

リコンビナントLECT2b(動物細胞発現)は、³⁵S-メチオニンによってメタボリックラベルし、CHO細胞の培養上清をSDSゲル電気泳動にかけることにより検出した。その結果、分子量が約14kDaと16kDaの2本のバンド(16kDaが主要であり、2つのバンドはプロセッシングの違いにより生じると考えられる)が得られ、リコンビナントLECT2bの分子量はほぼLECT2aの分子量約16kDaと一致した。

活性の検定

LECT2aについて既に記載したのと同様にして、リコンビナントLECT2bの白血球活性化活性を評価した。その結果の一部を表3に示す。

【0037】

【表3】

表3. LECT2bの白血球活性化活性

| LECT2b濃度(M) | 酵 素 放 出 (%Release*) MPO | | | 活 性 酸 素 産 生 (nmoles/ml) | | |
|-------------------|-------------------------------|------|-----------------------------|----------------------------|-------|-----------------------------|
| | - | CB | CB+fMLP(10 ⁻⁷ M) | - | CB | CB+fMLP(10 ⁻⁷ M) |
| 0 | 14.6 | 10.3 | 38.4 | 0 | 0 | 16.849 |
| 10 ⁻¹¹ | 11.8 | 8.9 | 37.1 | -1.694 | 0 | 17.720 |
| 10 ⁻¹⁰ | 11.8 | 8.9 | 37.5 | 0 | 0 | 16.268 |
| 10 ⁻⁹ | 13.2 | 10.2 | 33.9 | 1.220 | 0.508 | 18.301 |
| 10 ⁻⁸ | 12.6 | 10.0 | 33.9 | 0.678 | 0.813 | 22.876 |
| 10 ⁻⁷ | 12.7 | 10.9 | 36.9 | 0 | 0 | 21.860 |
| 10 ⁻⁶ | 15.3 | 13.6 | 44.0 | 1.017 | 1.627 | 22.876 |
| 10 ⁻⁵ | 21.8 | 17.2 | 55.3 | 0 | 1.017 | 20.335 |

* %Release = 100×細胞外活性/(細胞外活性+細胞内活性)

【0038】

【発明の効果】本発明の物質は、免疫細胞に関与する新しいサイトカイン/インターロイキンであるところから、腫瘍免疫としての治療、診断はもちろん、癌予知および癌予後の免疫反応の検出などに利用できる。また、腫瘍の治療への応用の可能性も充分考えられる。さらに、好中球をはじめとする炎症細胞に関与することから、慢性炎症にも深くかかわっていることが推定されるので、これら疾病の診断、治療をはじめ、サイトカインネットワーク機能異常、免疫不全を検出する新しい基礎研究に道を開くことができる。

配列

Gly Pro Trp Ala Ile Ile Cys Ala Gly Lys Ser Ser Asn Glu Ile Arg
1 5 10 15
Thr Cys Asp Gly His Gly Cys Gly Gln Tyr Thr Ala Gln Arg Asn Gln
20 25 30

※【0039】

【配列表】

配列番号：1
配列の長さ：54
配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：タンパク質
フラグメント型：N-末端フラグメント
起源：ヒト
細胞の種類：T細胞系白血病細胞
セルライン：SKW-3

13
Lys Leu His Gln Gly Val Asp Val Leu Cys Ser Asp Gly Ser Thr Val
35 40 45
Tyr Ala Pro Phe Thr Gly
50

【0040】配列番号：2

配列の長さ：10

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

フラグメント型：中間部フラグメント

起源：ヒト

細胞の種類：T細胞系白血病癌細胞

セルライン：SKW-3

配列

Ile Met Gly Gln Glu Lys Pro Tyr Lys Asn
1 5 10

【0041】配列番号：3

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

フラグメント型：中間部フラグメント

起源：ヒト

細胞の種類：T細胞系白血病癌細胞

セルライン：SKW-3

配列

Ile Ser Gly Gly Gly Phe Cys Ile Lys
1 5

【0042】配列番号：4

配列の長さ：5

配列

Val Tyr Pro Gly Ile Gln Ser His Ile His Ile Glu Asn Cys Asp Leu
1 5 10 15
Ser Asp Pro Thr
20

【0044】配列番号：6

配列の長さ：151

配列の型：アミノ酸

配列

Met Phe Ser Thr Lys Ala Leu Leu Leu Ala Gly Leu Ile Ser Thr Ala
1 5 10 15
Leu Ala Gly Pro Trp Ala Asn Ile Cys Ala Gly Lys Ser Ser Asn Glu
20 25 30
Ile Arg Thr Cys Asp Arg His Gly Cys Gly Gln Tyr Ser Ala Gln Arg
35 40 45
Ser Gln Arg Pro His Gln Gly Val Asp Val Leu Cys Ser Ala Gly Ser
50 55 60
Thr Val Tyr Ala Pro Phe Thr Gly Met Ile Val Gly Gln Glu Lys Pro
65 70 75 80
Tyr Gln Asn Lys Asn Ala Ile Asn Asn Gly Val Arg Ile Ser Gly Arg

* 配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

フラグメント型：中間部フラグメント

起源：ヒト

10 細胞の種類：T細胞系白血病癌細胞

セルライン：SKW-3

配列

Tyr Lys Gly Ser Ile
1 5

【0043】配列番号：5

配列の長さ：20

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

20 フラグメント型：中間部フラグメント

起源：ヒト

細胞の種類：T細胞系白血病癌細胞

セルライン：SKW-3

*30

※トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

※

備考：アミノ酸番号58のVal*はIleであってもよい。

* 特徴を決定した方法：P

特徴を表す記号：CDS

存在位置：201...656

特徴を決定した方法：P

特徴を表す記号: `mutation`

存在位置: `replace(372, "a")`

replace (748, "g")

replace (961, "c")

replace (967, "c")

20 特徴を決定した方法：E

特徴を表す記号: polyA signal

存在位置：6 8 4...6 8 9

1060...1065

* 特徴を決定した方法：E

AATCAAATA GCTATCCATG GAATATTAGA ACTTGACTTG CTCCATCCTC TTAAACTTTT 60
 TGTGTCTCAC ACTAAAGAAA TGAGAGATGC AGAATTCTAA GGCTAAATAG CTAGGAAGTA 120
 TTCATTCAA CTTGAATATC TTCAAAGAGA GTGTGGGGCC AACTCTAATC AGAGGAAGAA 180
 ACTAAAGGAA GTAAACCAG ATG TTT TCC ACC AAA GCC CTC CTT TTG 227
 Met Phe Ser Thr Lys Ala Leu Leu Leu

[illegible]

17 18
 Lys Pro Ile Lys Tyr Lys Gly Pro Ile Lys Lys Gly Glu Lys Leu Gly
 110 115 120
 ACT CTA TTG CCC TTG CAG AAA GTT TAT CCT CGC ATA CAA TCG CAT GTG 611
 Thr Leu Leu Pro Leu Gln Lys Val Tyr Pro Gly Ile Gln Ser His Val
 125 130 135
 CAC ATT GAA AAC TGT GAC TCG AGT GAC CCT ACT GCA TAC CTG 653
 His Ile Glu Asn Cys Asp Ser Ser Asp Pro Thr Ala Tyr Leu
 140 145 150
 TAAATCGAAG GCCAATGGTC AGATCTTCAA AATAAAAAAGT CATCTTAAAA ACCTGGATGC 713
 ATACCCCTTCT CTTCAAGAAA TTTGTGTTCA CAAAAGAAAA ATGCATGAAG CGATGGATAC 773
 CCCATTTTCC ATGACATGAT TATTACACAT TGCATGCCCTG TATCAAAACA TCTCAGGTAC 833
 CTCATAAACA TATACACCTA TGTACCCACA AAAATTTTTT AATTAATAAA ACGAAATTTC 893
 AGTTTAAATA GAAACATGAT AAATGCAAGA AAGAAAACAT TTTGATTTTA ACTCATTGTC 953
 ACTCTGATGT TCATGTGAAC TGGTTGCTTC GGGCTCTTTC ATCTGTCACC TATCGAATCT 1013
 GAGTGGTTTT ATTTTTTAGA TTTCTCAGTC CCAAAGATCT AAGATAAATA AACAAAGAGAA 1073
 CTTAAAAAAA AAAAAAAAAA 1092

備考：アミノ酸番号58のValはIleの場合もあり、その場合、ヌクレオチド番号372～374のGTCはATCである。

[0046]

配列番号：8

(LECT2aとLECT2bの比較)

| | | | | |
|--------|-----|-----|-----|-----|
| | 1 | 5 | 10 | 15 |
| LECT2b | Met | Phe | Ser | Thr |
| LECT2a | | | | |
| | 20 | 25 | 30 | |
| LECT2b | Ala | Leu | Ala | Gly |
| LECT2a | | | | |
| | 35 | 40 | 45 | |
| LECT2b | Asn | Glu | Ile | Arg |
| LECT2a | | | | |
| | 50 | 55 | 60 | |
| LECT2b | Ala | Gln | Arg | Ser |
| LECT2a | | | | |
| | 65 | 70 | 75 | |
| LECT2b | Ser | Ala | Gly | Ser |
| LECT2a | | | | |
| | 80 | 85 | 90 | |
| LECT2b | Gly | Gln | Glu | Lys |
| LECT2a | | | | |
| | 95 | 100 | 105 | |
| LECT2b | Val | Arg | Ile | Ser |
| LECT2a | | | | |
| | 110 | 115 | 120 | |
| LECT2b | Lys | Pro | Ile | Lys |
| LECT2a | | | | |
| | 125 | 130 | 135 | |
| LECT2b | Gly | Thr | Leu | Leu |
| LECT2a | | | | |
| | 140 | 145 | 150 | |
| LECT2b | His | Val | His | Ile |

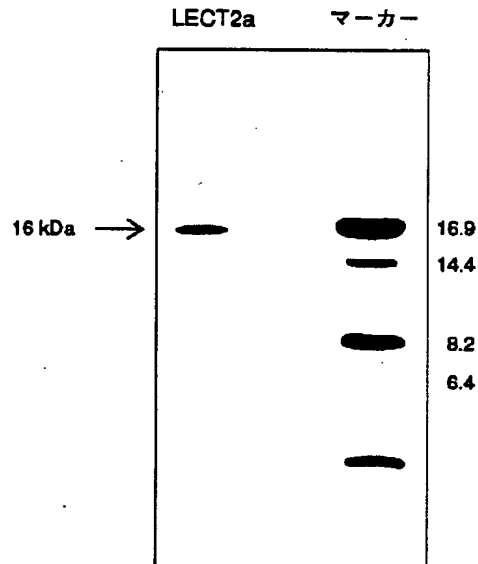
LECT2a His Ile His Ile Glu Asn Cys Asp Leu Ser Asp Pro Thr
 151
 LECT2b Leu
 LECT2a

【図面の簡単な説明】

* する。

【図1】 LECT2 aのSDS-PAGEを表す図であ*

【図1】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶
 C 1 2 N 5/10
 // A 6 1 K 38/00

識別記号

片内整理番号

F I

技術表示箇所

A D U

A 6 1 K 37/02

A D U